

Heteromorfizmi kromosoma čovjeka u poremećajima reprodukcije

Heteromorphisms of human chromosomes in reproductive disorders

Alena Buretić-Tomljanović*, Andrea Šverko

Zavod za biologiju i medicinsku genetiku,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
Rijeka

Primljeno: 5. 12. 2012.

Prihvaćeno: 11. 2. 2013.

Adresa za dopisivanje:

*Prof. dr. sc. Alena Buretić-Tomljanović,
dipl. ing.

Zavod za biologiju i medicinsku genetiku
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 22, 51 000 Rijeka
e-mail: alenabt@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

Sažetak. Cilj: U radu je istražena učestalost varijanata konstitutivnog heterokromatina (KH) u osoba s različitim poremećajima reprodukcije (primarni ili sekundarni sterilitet, jedan ili više spontanih pobačaja), te kliničkim dijagnozama kriptorhizma ili hipogonadizma, gojaznosti ili ginekomastije. **Metode:** Prisutnost kromosomskih heteromorfizama procijenjena je u 499 osoba tijekom rutinske kariotipizacije izvedene na GTG-opruganim metafaznim kromosomima dobivenim iz fitohemaglutininom stimuliranih limfocita periferne krvi. **Rezultati:** Varijante KH-a u pronađene su u 22,6 % ispitanika. Najviša je učestalost nositelja zabilježena u skupini s primarnim sterilitetom (28,7 %) i značajno je viša negoli u skupini s dva ili više spontanih pobačaja (15,4 %) (OR = 2,209; CI = 1,175 – 4,153; P = 0,014). Od pojedinačnih varijanata najčešće su zabilježene varijacije D-grupe kromosoma (9,6 %), a slijede varijante 9qh, Yqh, 16qh, varijante G-grupe i 1qh (5,1 %, 4,9 %, 4,0 %, 2,7 % i 2,0 %). Varijanta heterokromatina inv(9) pojavljuje se učestalošću od 1,6 %. Budući da su pojedini ispitanici (6,5 %) nositelji multiplih varijanata, ukupan broj varijanata u pojedinim dijagnostičkim skupinama varira između 20,2 % i 39,6 %. Ponovno, najviša je učestalost u skupini s primarnim sterilitetom (39,6 %), dok je najniža u skupini s dva ili više spontanih pobačaja (20,2 %) (OR = 2,595; CI = 1,465 – 4,598; P = 0,001). **Zaključak:** Značajno viša učestalost kromosomskih heteromorfizama u osoba s primarnim sterilitetom podupire hipotezu prema kojoj kromosomski heteromorfizmi nisu bezazlene varijante, već bi mogli, mehanizmima koje ne razumijemo u potpunosti, umanjivati reproduktivnu sposobnost čovjeka.

Glavne riječi: hipogonadizam, kromosomski heteromorfizmi, patološka trudnoća, ponavljani spontani pobačaji, sterilitet, zaostatak u rastu i razvoju

Abstract. Aim: The frequency of heterochromatin variants was determined in the group of patients with defective reproductive fitness (primary or secondary sterility, history of one or more spontaneous abortions), in those with clinical diagnoses of cryptorchidism or hypogonadism, and obesity or gynecomastia. **Methods:** The chromosomal heteromorphisms were evaluated in 447 individuals during routine karyotyping on GTG-banded metaphase slides prepared from phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood lymphocytes. **Results:** The overall frequency of heterochromatin variants was 22.6 %. The highest frequency of variants was determined in the primary sterility group (28.7 %). The difference was statistically significant in comparison with the two or more – spontaneous abortion group (15.4 %) (OR=2,209; CI=1,175-4,153; P=0,014). The most frequent were D-group chromosomal variants (9,6 %) followed by 9qh, Yqh, 16qh, G-group variants and 1qh (5,1 %, 4,9 %, 4,0 %, 2,7 % and 2,0 %, respectively). The variant inv(9) was represented with 1.6 %. Because 6,5 % of subjects in the study carried multiple variants in their karyotype, the total number of variants between diagnoses varied between 20,2 % and 39,6 %. The highest frequency of variants was observed in the primary sterility group (39,6 %). It was significantly different when compared to the two or more – spontaneous abortion group (20,2 %) (OR=2,595; CI=1,465-4,598; P=0,001). **Conclusion:** Significantly higher frequency of chromosomal heteromorphisms in individuals with primary sterility supports the view of chromosomal variants being not harmless variants. By mechanism(s) not fully understood yet, chromosomal heteromorphisms might decrease the reproductive fitness in humans.

Key words: chromosomal heteromorphisms, growth and development retardation, hypogonadism, pathological pregnancy, recurrent spontaneous abortions, sterility

UVOD

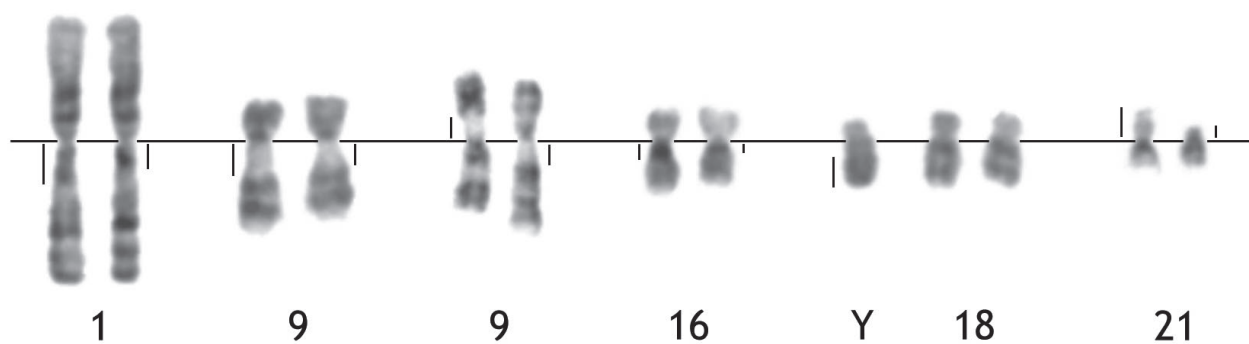
Pojedini dijelovi genoma čovjeka sadrže vrlo varijabilnu količinu nekodirajućih, ponavljanih DNA sljedova, što označavamo citogenetičkim heteromorfizmima ili polimorfnim kromosomskim varijantama. Najvarijabilniji dijelovi genoma obuhvaćaju centromerna i pericentrična područja kromosoma 1, 9 i 16, drške (engl. *stalks*) i satelite kratkih (p) krakova akrocentrika, te distalni dio dugog (q) kraka kromosoma Y. Radi se o različitom broju ponavljanja alfa satelitskih, klasičnih satelitskih (satelitske DNA I, II i III) i drugih ponovljenih DNA sljedova organiziranih, uz pomoć RNA i proteina, u blok visokokondenziranog konstitutivnog heterokromatina (KH)¹. Citogenetičkim heteromorfizmom smatraju se duplikacije i delecije blokova heterokromatina. Njihovi pojedini građevni DNA sljedovi "skloni" su lomovima i prespajanjima, pa nastaju i inverzijske varijante^{2,3}. Na kratkim krakovima akrocentričnih kromosoma koji izrazito variraju veličinom i intenzitetom bojanja opisani su i ekstremni heteromorfizmi: npr. naizgled izgubljen p krak kromosoma 21, ili ekstremno povećan p krak kromosoma 15^{4,5}. Kromosomski se heteromorfizmi smatraju varijacijama u genomu bez posebnog fenotipskog učinka, nasljeđuju se, i uobičajeno se ne navode u citogenetičkim izvješćima (slika 1).

Tijekom 80-ih godina prošlog stoljeća kromosomski heteromorfizmi intenzivno su istraživani povezano sa smanjenom reproduktivnom sposob-

nošću muškaraca, ponavljanim spontanom pobačajima i urođenim malformacijama nepoznate etiologije⁶⁻¹², no rezultati nisu pružili čvrste dokaze o njihovom štetnom utjecaju na fenotip. Učinak kromosomskih varijanata na fenotip ostao je nejasan, pa tijekom posljednjeg desetljeća ponovno zaokuplja pažnju istraživača. Budući da je uloga KH-a prepoznata tijekom mejotičke konjugacije homolognih kromosoma u *Drosophila*, pretpostavljeno je da bi prisutnost varijante na jednom homologu mogla ometati normalno sparivanje i razdvajanje s

FISH analize (engl. *fluorescent in situ hybridization*) potvrdile su višu učestalost aneuploidija u spermijima osoba s polimorfizmom heterokromatina. Dinamika ponovljene, nekodirajuće DNA upućuje na mogućnost nejednake rekombinacije (engl. *unequal crossing-over*) između dvaju homologa tijekom stanične diobe, što može rezultirati pojavom inverzijskih polimorfizama, delecija i duplikacija.

drugim homologom tijekom mejoze¹³. Također je pretpostavljena mogućnost interkromosomskog učinka (učinak na razdvajanje drugih parova homolognih kromosoma)^{14,15}. FISH (engl. *fluorescent in situ hybridization*) analize potvrdile su višu učestalost aneuploidija u spermijima osoba s polimorfizmom heterokromatina¹⁶. Dinamika ponovljene, nekodirajuće DNA upućuje na mogućnost nejednake rekombinacije (engl. *unequal crossing-over*)



Slika 1. Homologni kromosomi 1, 9, 16, Y i 21 s heteromorfizmima konstitutivnog heterokromatina 1qh+, 9qh+, inv(9), Yqh+ i 21pstk+ (lijevi homolog u paru sadrži heteromorfizam; homologni par kromosoma 18 prikazan je radi usporedbe veličine kromosoma Y). Crtice označavaju varijabilni dio kromosoma.

Figure 1 Homologous chromosome pairs 1, 9, 16, Y and 21 with shown heteromorphisms of the constitutive heterochromatin: 1qh+, 9qh+, inv(9), Yqh+, and 21pstk+ (chromosome on the left carries the heteromorphism; homologous pair 18 is shown for comparison purpose with the size of chromosome Y). Variable chromosomal parts are marked with dashes.

između dvaju homologa tijekom stanične diobe, što može rezultirati pojavom inverzijskih polimorfizama, delecija i duplikacija. Također postoji mogućnost abnormalnog vezanja kromosoma s heteromorfizmom za diobeno vreteno ili nishodne regulacije inače normalno izraženih gena u blizini varijante, što bi moglo prouzročiti pogreške kromosomskog razdvajanja ili zastoj spermatogeneze. Značajno više učestalosti kromosomskih varijanata, negoli u kontroli, pronađene su u muškaraca s idiopatskom neplodnošću, u jednog ili oba partnera u parova s ponavljanim spontanitim pobačajima i u osoba s anamnezom patološke trudnoće¹⁶⁻¹⁹. Najčešće varijante KH-a pronađene u osoba smanjene plodnosti jesu 1qh+, 9qh+, 16qh+ i Yqh-, a slijede varijacije p krakova akrocentričnih kromosoma. U neplodnih muškaraca najveća je učestalost heteromorfizama u onih s kliničkim dijagnozama azoospermije i oligozoospermije, dok je u žena učestalost najviša u onih s primarnom neplodnošću¹⁸. Rezultat istraživanja 1.978 kineskih bračnih parova uključenih u programe medicinski potpomognute oplodnje: *in vitro* oplodnje (engl. *in vitro fertilization*; IVF) i intracitoplazmatske injekcije spermija (engl. *IntraCytoplasmic Sperm Injection*; ICSI) upućuje da kvantitativne i kvalitativne varijacije KH-a ne utječu negativno na ishode tih programa²⁰. Ipak, isti su autori²⁰ zabilježili trend veće učestalosti spontanitim pobačaja u onih parova u kojih je nositelj heteromorfizma bio muškarac negoli u slučajevima kada je nositelj bila žena. U ovom radu istražena je učestalost varijanata KH-a otkrivenih tijekom višegodišnjeg obavljanja rutinske kariotipizacije osoba s različitim poremećajima reprodukcije. Dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima drugih studija.

ISPITANICI I METODE

U razdoblju od 15 godina (između 1996. i 2011.) u citogenetičkom je laboratoriju Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci kariotipizirano više od 1.200 ispitanika s različitim kliničkim dijagnozama. Retrospektivnom analizom izdvojeno je 447 ispitanika (155 žena i 292 muškarca) sa sljedećim uputnim dijagnozama: primarni sterilitet, sekundarni sterilitet, jedan spontani pobačaj, dva ili više spontanitim pobačaja, patološka trudnoća u anamnezi (zastoj intrauterinog razvoja, *blighted ovum*, rana smrt ploda, malformirani plod), hipogonadizam, kriptorhizam, ginekomastija i adipositas (gojaznost). Dob ispitanika u trenutku evaluacije i prema kliničkim dijagnozama prikazana je tablicom 1. U ispitivanu skupinu nisu uvršteni ispitanici u kojih su pronađene numeričke ili strukturne kromosomske promjene, stoga svi ispitanici uključeni u studiju posjeduju uredan muški ili ženski kariotip analiziran GTG-oprugavanjem. Kariotipizacija limfocita periferne krvi obavljena je prema standardnoj metodi²¹. Uobičajeno je pregledano 20 – 30 metafaza po jednom ispitaniku, a 5 – 10 ih je rutinski kariotipizirano uporabom svjetlosnog mikroskopa. Za analizu je od 2003. godine korišten svjetlosni mikroskop BX51 (Olympus) te kompjutorska programska podrška CytoVision Applied Imaging Corp, Santa Clara (CA), dok su ranije kariotipizacije obavljene pomoću svjetlosnog mikroskopa Reichert Microstar IV. Desetak metafaza rutinski je fotografirano i analizirano, a preostale metafaze analizirane su pod mikroskopom. Pregledom arhivirane dokumentacije evaluirano je postojanje kromosomskih varijanata kromoso-

Tablica 1. Klinički i demografski podaci ispitanika

Table 1 Clinical and demographic data of subjects in the study

		N (m/ž)	DOB – m	DOB – ž
primarni sterilitet	DG1	127/37	33,88 ± 5,75	25,50 ± 7,51
sekundarni sterilitet	DG2	10/14	24,92 ± 7,26	34,22 ± 3,53
SAB ³ 2 (uključuje i partnere)	DG3	51/53	33,35 ± 5,67	30,52 ± 5,02
SAB x 1 (uključuje i partnere)	DG4	17/22	32,31 ± 3,50	30,32 ± 4,96
patološka trudnoća ^a	DG5	25/27	30,64 ± 6,51	27,56 ± 4,53
kriptorhizam, hipogonadizam	DG6	38/-	19,27 ± 10,25	-
adipositas, ginekomastija	DG7	24/2	12,68 ± 5,67	11,50 ± 0,71

^a intrauterini zastoj rasta, malformirani plod, *blighted ovum*, rana smrt ploda

ma 1,9,16,Y i kromosoma D- i G-grupe u uzorku od 447 ispitanika. Demografski i klinički podaci prikazani su u tablici 1. Kromosomske varijante ili heteromorfizmi bilježeni su uporabom međunarodnog sustava za nomenklaturu kromosoma (International System for Chromosome Nomenclature – ISCN 2009): 1qh+/-, 9qh+/-, 16qh+/-, Yqh+/- . Također su evaluirane varijacije citoloških satelita (ps+) i p krakova (pstk+) akrocentričnih kromosoma D- i G-grupe. Kao heteromorfizmi evaluirani su pericentrična inverzija kromosoma 9 – inv(9) i nedostatak p kraka akrocentričnih kromosoma (kratki krak naizgled nedostaje na citogenetičkom preparatu).

Heteromorfizam je na jednom homolognom kromosomu klasificiran kao varijanta qh+ ako je smješten na q kraku kromosoma iako je barem dvostruko veći negoli na drugom homologu. Varijanta Yqh+ klasificirana je u slučajevima kada je kromosom Y veličinom odgovarao kromosomu 18, a Yqh- u slučajevima kada je kromosom Y veličinom odgovarao kromosomima G-grupe (malim akrocentricima).

Statističke metode

U statističkoj obradi podataka korištena je deskriptivna statistika računalnog programa Statistika for Windows 8.0 (StatSoft Inc.) Također su izračunati omjeri izgleda (engl. *Odds ratio*; OR) i 95 %-tni intervali pouzdanosti (engl. *confidence interval*; CI) između pojedinih dijagnostičkih skupina. Razina statističke značajnosti iznosila je 0,05.

REZULTATI

Tablica 2 prikazuje učestalost nositelja kromosomskih varijanata s obzirom na kliničku dijagnozu. Od ukupnog broja ispitanika 16,1 % (72/447) ima jednu varijantu, 5,4 % (24/447) ima dvije, a 1,1 % su nositelji triju kromosomskih varijanata (5/447). U prosjeku 22,6 % osoba u uzorku posjeduje barem jednu kromosomsku varijantu. Kromosomske varijante su podjednako učestalošću pronađene u osoba muškog i ženskog spola. Ako usporedimo učestalost nositelja varijanata prema kliničkoj dijagnozi, najveći broj nositelja postoji u skupini s kliničkom dijagnozom primarnog steriliteta (28,7 % ili 47/164), a najmanji u onih s dijagnozom hipogonadizma ili kriptorhizma (13,2 % ili 5/38). Učestalost varijanata je u osoba s dijagnozom primarnog steriliteta statistički značajno viša negoli u parova s dva i više spontanijeh pobačaja (OR = 2,209; 95 % CI = 1,175 – 4,153; $P = 0,014$) i rubno značajno viša negoli u ispitanika s hipogonadizmom ili kriptorhizmom (OR = 2,651; 95 % CI = 0,976 – 7,204; $P = 0,056$), ali bitnih razlika nema u odnosu prema ostalim dijagnostičkim skupinama.

Dio ispitanika (6,5 %) su nosioci dviju ili triju varijanata (tablica 2). Najviša je učestalost nositelja multiplih heteromorfizama u skupinama s dijagnozom primarnog steriliteta (9,7 %), kriptorhizma ili hipogonadizma (7,9 %) i gojivosti ili ginekomastije (7,7 %). U ostalim dijagnostičkim skupinama ta je učestalost niža od 5 %. Razlike između skupina nisu statistički značajne.

Tablica 2. Broj i učestalost varijanata heterokromatina prema kliničkoj dijagnozi

Table 2 The number and frequency of heterochromatin variants according to clinical diagnoses

Klinička dijagnoza	N	bez varijante	1 var	2 var	3 var	broj osoba s heteromorfizmom Σn (%)
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
DG1	164	117 (71,3)	31 (18,9)	14 (8,5)	2 (1,2)	47 (28,7) ^{a,b}
DG2	24	19 (79,2)	5 (20,8)	0	0	5 (20,8)
DG3	104	88 (84,6)	11 (10,6)	5 (4,8)	0	16 (15,4) ^a
DG4	39	29 (74,4)	9 (23,1)	0	1 (2,6)	10 (25,6)
DG5	52	39 (75,0)	11 (21,2)	2 (3,8)	0	13 (25,0)
DG6	38	33 (86,8)	2 (5,3)	1 (2,6)	2 (5,3)	5 (13,2) ^b
DG7	26	21 (80,8)	3 (11,5)	2 (7,7)	0	5 (19,2)
Σ (%)	447	346 (77,4)	72 (16,1)	24 (5,4)	5 (1,1)	101 (22,6)

^aOR = 2,209; 95 % CI = 1,175 – 4,153; $P = 0,014$

^bOR = 2,651; 95 % CI = 0,976 – 7,204; $P = 0,056$

Analiza ukupnog broja varijanata (tablica 3) pokazuje da su u cijelom uzorku najčešće pronađene varijante D-grupe kromosoma (9,6 %), slijede heteromorfizmi 9qh (5,1 %), Yqh (4,9 %) i 16qh (4,0 %), pa varijante G-grupe kromosoma (2,7 %) i heteromorfizam 1qh (2,0 %), dok je najniža zabilježena učestalost pericentrične inverzije heterokromatina kromosoma 9 (1,6 %).

Ukupan broj varijanata u pojedinim dijagnostičkim skupinama varira između 20,2 % i 39,6 %. Ponovno, najviša je učestalost u skupini s primarnim sterilitetom (39,6 %), a najniža je u skupinama s dva i više spontanijeh pobačaja (20,2 %) i sekundarnim sterilitetom (20,8 %). Razlika je ponovno statistički značajna u skupini s primarnim sterilitetom u odnosu prema skupini s ponavljanim spontanijeh pobačajima (OR = 2,595; CI = 1,465 – 4,598; $P = 0,001$).

RASPRAVA

Polimorfne varijacije KH-a ponovno su tijekom protekloga desetljeća u žarištu istraživanja^{16-20,22-24}. Intenzivna citogenetička istraživanja koja su provedena tijekom 80-ih godina prošloga stoljeća rezultirala su vrlo različitim gledištima na potencijalne uloge KH-a i DNA sljedova koji ga izgrađuju. Već su tada bili prepoznati ili predloženi neki učinci KH-a, kao što su uloga u funkciji centromere/kinetohore, uloga u prepoznavanju homologa tijekom mejoze, supresija transkripcije susjednih gena, supresija mejotičke rekombinacije u susjednom eukromatinu, uloga u organizaciji interfazne jezgre, kao i moguće adaptivno značenje ukupnog heterokromatina u stanici. Jedna od

tadašnjih hipoteza pretpostavlja da, u organizmima eukariotskog tipa, postoji kompenzacijski mehanizam koji djeluje među kromosomima s većim blokovima heterokromatina, a u stanicama pojedine biološke vrste nastoji održati ukupnu količinu heterokromatina više-manje konstantnom^{8,9,25}. Na to upućuje činjenica da su koeficijenti varijabilnosti pojedinačnih varijanata najveći, a smanjuju se kada se mjeri ukupni heterokromatin istih kromosoma. U slučajevima povećane ili smanjene količine heterokromatina u stanicama (nebalansirana količina) KH bi mogao remetiti normalan rast i razvoj organizma, uzrokujući multiple, nespecifične malformacije ili rane gubitke ploda⁷⁻⁹. U prilog toj hipotezi svjedoče i noviji rezultati. Obiteljski polimorfizam 16qh-, naslijeđen od djeda po majci, pronađen je u multiplih embrija tijekom nekoliko uzastopnih neuspješnih postupaka medicinski potpomognute oplodnje (*in vitro* oplodnje – IVF)²⁶. Nadalje, detaljnom molekularnom analizom u nekoliko slučajeva prenatalno i postnatalno otkrivenih ekstremnih varijanata 21p- udruženih s multiplim prirođenim anomalijama ili blagom mentalnom zaostalošću autori su potvrdili gubitak telomernih i subtelomernih DNA sljedova kratkoga kraka kromosoma 21, te predložili moguć štetan učinak tih varijanata^{27,28}. Kao mehanizam štetnog djelovanja predložili su učinak položaja i interakcije gena na cjelokupnu organizaciju i funkciju genoma.

Dakle, heteromorfizam KH-a se, osim na citološkoj razini, očituje i na molekularnoj razini varijabilnom količinom različitih obitelji visokoponovljenih i drugih DNA sljedova. U novije je vrijeme

Tablica 3. Broj i učestalost pojedinačnih varijanata heterokromatina
Table 3 The number and frequency of individual heterochromatin variants

		DG 1 ^b	DG 2	DG 3 ^b	DG 4	DG 5	DG 6	DG 7	Σn %
		N = 164	N = 24	N = 104	N = 39	N = 52	N = 38	N = 26	
1qh	n (%)	5 (3,1)	0	2 (1,9)	0	1 (1,9)	1 (2,6)	0	9 (2,0)
9qh ^a	n (%)	12 (7,3)	2 (8,3)	4 (3,8)	2 (5,1)	2 (3,8)	2 (5,3)	1 (3,8)	23 (5,1)
inv(9)	n (%)	3 (1,8)	0	3 (2,9)	0	1 (1,9)	0	0	7 (1,6)
16qh ^a	n (%)	5 (3,0)	0	6 (5,8)	2 (5,1)	0	2 (5,3)	3 (11,5)	18 (4,0)
Yqh ^a	n (%)	19 (11,6)	1 (4,2)	0	0	1 (1,9)	1 (3,6)	0	22 (4,9)
D-grupa	n (%)	16 (9,8)	2 (8,3)	4 (3,8)	7 (17,9)	7 (13,5)	4 (10,5)	3 (11,5)	43 (9,6)
G-grupa	n (%)	5 (3,0)	0	2 (1,9)	1 (2,6)	3 (5,8)	1 (2,6)	0	12 (2,7)
Σn (%)	n (%)	65 (39,6)	5 (20,8)	21 (20,2)	12 (30,8)	15 (28,8)	11 (28,9)	7 (26,9)	136 (30,4)

^auključuje qh+ i qh- varijante

^bOR = 2,595; CI = 1,465 – 4,598; $P = 0,001$

otkriveno da su visokoponovljeni DNA sljedovi, smješteni u području kromosomskih centromera i pericentrično, transkripcijski aktivni unatoč činjenici da ne sadrže gene s ulogom kodiranja proteina²⁹. Transkripcija DNA sljedova KH-a dokazana je tijekom različitih stupnjeva razvitka sisavaca, kao i tijekom stanične diferencijacije, proliferacije ili adaptacije na djelovanje čimbenika stresa. Stoga su centromerni i pericentrični DNA sljedovi ne samo centri organizacije funkcionalnih centromera/kinetohora, već su i mogući centri genske regulacije blisko smještenih gena²⁹. S obzirom na to da se prepisuju (dekondenziraju), vjerojatan je i njihov učinak na funkcionalnu organizaciju čitave jezgre. Sekvenciranjem dijela kratkog kraka kromosoma 21 otkriveni su i DNA sljedovi koji nalikuju eukromatinu, a specifični transkripti pojavljuju se prosječno jednom u svakih 100 kb³⁰. Ti nalazi upućuju na veću složenost tih kromosomskih područja od one očekivane, te na mogućnost da KH "nosi" dodatne funkcionalne elemente i posjeduje evolucijski važne informacije^{30,31}.

Učestalosti varijanata KH-a su u osoba s poremećajima reprodukcije značajno više negoli u kontrolnim skupinama (tablica 4), što upućuje na potencijalnu ulogu varijacija KH-a u reproduktivnoj sposobnosti čovjeka. Vrijednosti se kreću od 4,9 % (u infertilnih muškaraca u japanskoj populaciji) do 64,8 % (u parova s patološkom trudnoćom u indijskoj populaciji). Iako postoji mogućnost različitih kriterija evaluacije varijacija KH-a (svi autori nisu precizirali kriterije), usporedbom učestalosti u različitim populacijama mogu se uočiti određene interpopulacijske razlike. Primjerice, visoka učestalost varijante 1qh objavljena je u japanskih muškaraca s potvrđenom azoospermijom (9,8 %), dok ista varijanta uopće nije zabilježena u Indijaca (tablica 4)¹⁷⁻¹⁹. Nadalje, u skupini od 1.790 infertilnih japanskih muškaraca nisu zabilježene varijante kromosoma Y¹⁷. U turskoj su populaciji objavljene znatno niže učestalosti varijanata heterokromatina i u skupinama s poremećajima reprodukcije (6,5 % – 10 %), kao i u kontrolnih individua (1,8 % – 2,7 %) u odnosu prema drugim populacijama (tablica 4)^{16,23,24}. Unatoč tome, turske studije bilježe značajno višu učestalost kromosomskih varijanata u parova s ponavljanim spontanim pobačajima i/ili patološkom trudnoćom negoli u kontrolnim skupinama^{24,32}.

U literaturi postoji vrlo malo podataka o učestalosti pojedinih varijanata u općoj populaciji. Rijetke su studije objavile i učestalost varijanata u kontrolnim skupinama. Minocherhomji i sur.¹⁸ objavili su učestalost varijacija KH-a od 21,4 % u indijskoj kontroli, dok je za usporedbu u grupama s ponavljanim spontanim pobačajima ili patološkom trudnoćom učestalost iznosila 43,4 %, odnosno 64,8 %. Yakin i sur.¹⁶ pronašli su 2,7 % heteromorfizama KH-a u 183 turska fertilna muškarca, dok je u skupini od 420 infertilnih muškaraca uče-

Visokoponovljeni DNA sljedovi smješteni u području kromosomskih centromera i pericentrično su transkripcijski aktivni unatoč činjenici da ne sadrže gene s ulogom kodiranja proteina. Transkripcija tih DNA sljedova dokazana je tijekom različitih stupnjeva razvitka sisavaca, kao i tijekom stanične diferencijacije, proliferacije ili adaptacije na djelovanje čimbenika stresa. Stoga centromerni i pericentrični DNA sljedovi nisu samo centri organizacije funkcionalnih centromera/kinetohora, već su i mogući centri genske regulacije blisko smještenih gena. S obzirom na to da se prepisuju (dekondenziraju), vjerojatan je i njihov učinak na funkcionalnu organizaciju čitave jezgre.

stalost varijanata bila četverostruko viša i iznosila 11,0 %. U našem se uzorku učestalost kromosomskih heteromorfizama kreće između 13,2 % i 28,7 %, ovisno o dijagnostičkoj skupini, a prosječno iznosi 22,6 %. Ako promotrimo ukupan broj varijanata u pojedinoj dijagnostičkoj skupini (tablica 3) ističe se ona primarnog steriliteta, u kojoj je učestalost varijanata najviša i iznosi 39,6 %. U toj su skupini najučestalije varijante Yqh, D-grupe kromosoma, te 9qh. Nije neobično da se varijanta Yqh, posebice Yqh-, pojavljuje u visokom postotku u infertilnih muškaraca naše i drugih populacija, izuzevši japansku, budući da se heterokromatinska pruga Yq12 izravno nastavlja na područje čimbenika azoospermije (engl. *azoospermia factor* – AZF) koje se nalazi u Yq11. Osim mogućnosti mikrolecija unutar AZF područja i/ili dijela Yq heterokromatina, postoji i mogućnost učinka smanjenog bloka heterokromatina na ekspresiju blisko smještenih (susjed-

Tablica 4. Broj i učestalost varijanata heterokromatina u različitim kliničkim skupinama i populacijama
Table 4 The number and frequency of heterochromatin variants in different clinical groups and populations

Studija	populacija	grupa	N	1qh ⁺	9qh ⁺	16qh ⁺	Yqh ⁺	inv(9)	inv(Y)	D-grupa	G-grupa	ukupno
				n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Nakamura i sur. (2001)	japanska	infertilni muškarci	1790	30 (1,7)	5 (0,3)	17 (0,9)	-	21 (1,2)	-	12 (0,7)	2 (0,1)	87 (4,9)
Nakamura i sur. (2001)	japanska	azoospermija	92	9 (9,8)	-	4 (4,3)	-	4 (4,3)	-	-	2 (1,1)	19 (20,7)
Nagvenkar i sur. (2005)	indijska	azoospermija	42	-	1 (2,4)	1 (2,4)	12 (28,6)	-	-	1 (2,4)	-	15 ^b (35,7)
Nagvenkar i sur. (2005)	indijska	oligozoospermija	46	-	3 (6,5)	-	15 (32,6)	1 (2,2)	2 (4,3)	-	1 (2,2)	22 ^b (47,8)
Minocherhomji i sur. (2009)	indijska	azoospermija i teška oligozoospermija	143	-	21 (14,7)	-	44 (30,8)	2 (1,4)	-	16 ^f (11,2)	-	83 (58,0)
Minocherhomji i sur. (2009)	indijska	neklasificirani prim. infertilitet ^b	258	-	42 (16,3)	-	14/73 (19,2)	2 (0,9)	1/73 (1,4)	29 ^f (11,2)	-	68 (26,4)
Minocherhomji i sur. (2009)	indijska	ponavljani spontani pobačaji ^c	53	-	7 (13,2)	-	2/15 (13,3)	-	-	14 ^f (26,4)	-	23 (43,4)
Minocherhomji i sur. (2009)	indijska	patološka trudnoća ^c	247	-	73 (29,6)	-	47/149 (31,5)	3 (1,2)	3/149 (2,0)	34 ^f (13,8)	-	160 (64,8)
Hong i sur. (2011)	kineska	neplodni parovi	1978	59/3956 (1,5)	26 (0,7)	23 (0,6)	152/1978 (7,3)	31/3956 (0,8)	3/1978 (0,2)	47/3956 (1,2)	31/3956 (0,8)	372/3956 (9,4)
Mafra i sur. (2011)	brazilska	infertilni muškarci	143	0	2 (1,4)	0	0	6 (4,2)	-	2 (1,4)	2 (1,4)	12/143 (8,4)
Yakin i sur. (2005) ^d	turska	azoospermija i oligoastenospem.	210	1 (0,5)	14 (6,7)	4 (1,9)	2 (0,1)	-	-	-	-	21 (10,0)
Sahin i sur. (2008)	turska	neklasificirani infertilitet	276	1 (0,4)	3 (1,1)	3 (1,1)	3 ^e (1,1)	4 (1,5)	-	4 (1,5)	-	18 (6,5)
Celep i sur. (2006)	turska	ponavljani SAB ili patološka trudnoća ^c	1290	25 (1,9)	39 (3,0)	18 (1,4)	-	16 (2,5)	-	10 (0,8)	-	113 ^g (8,8)
Minocherhomji i sur. (2009)	indijska	fertitine kontrole	555	-	31 (5,6)	-	30/212 (14,2)	1 (0,2)	2/212 (0,9)	55 ^f (9,9)	-	119 (21,4)
Sahin i sur. (2008)	turska	fetus (amniocenteza)	1130	-	1 (0,1)	1 (0,1)	1 (0,1)	8 (0,7)	-	6 (0,5)	2 (0,2)	20 ^f (1,8)

^auključene varijante qh⁺ i qh⁻; ^bmrtvorođeno, malformirano ili dijete s genetičkom abnormalnošću, žene s anatomskim defektima reproduktivnog sustava ili jedan spontani pobačaj u prvom tromesečju trudnoće; ^cuključuje oba supružnika; ^dYakin i sur. (2005), nema podataka za D- i G- grupu; učestalost varijanata u grupi fertitilnih muškaraca (5/183 ili 2,7 %);

^eomjer izračunan na ukupnom broju ispitanika (138 žena i 138 muškaraca); ^fprikazane D- i G-grupa zajedno; ^gpet ispitanika posjeduje multiple varijante (nije prikazano);

^hjedan ispitanik posjeduje multiple varijante (nije prikazano); ⁱjedan fetus posjeduje multiple varijante (nije prikazano)

nih) gena važnih za spermatogenezu. Istovremeno u svim se ostalim našim skupinama učestalost varijanata KH-a kreće između 20,2 % i 30,8 %. Najniže učestalosti varijanata KH-a zabilježili smo u skupinama ispitanika s dva ili više spontanijih pobačaja (20,2 %) i sekundarnim sterilitetom (20,8 %). Istovremeno su se u bračnim parovima s jednim spontanijim pobačajem, patološkom trudnoćom i u osoba s hipogonadizmom, kriptorhizmom, gojaznošću ili ginekomastijom u anamnezi učestalosti varijanata KH-a kretale od 26,9 % – 30,8 %. Stoga naši rezultati svjedoče u prilog hipotezi da kromosomski heteromorfizmi nisu bezazlene varijante, već da mogu značajno umanjiti reproduktivnu sposobnost čovjeka, iako zasad ne razumijemo u potpunosti mehanizme njihova djelovanja.

Dokle god detaljnije ne upoznamo molekularnu organizaciju ponovljenih i drugih DNA sljedova unutar blokova KH-a, kao i funkciju njihovih transkripta, nećemo moći povezati pojedine varijacije s poremećajima reprodukcije i drugim poremećajima čovjeka. Upućujemo na važnost bilježenja kromosomskih varijanata tijekom citogenetičkih analiza, kao i na nedostatak standarda u citogenetici za procjenu varijanata KH-a.

Uvođenje standarda uvelike bi olakšalo procjenu i usporedbu frekvencija varijanata u različitim populacijama.

LITERATURA

1. Kurnit DM. Satellite DNA and heterochromatin variants: the case for unequal mitotic crossing-over. *Hum Genet* 1979;47:169-86.
2. Ramesh KH, Verma RS. Breakpoints in alpha, beta, and satellite III DNA sequences of chromosome 9 result in a variety of pericentric inversions. *J Med Genet* 1996;33:395-8.
3. Verma RS, Ramesh KH, Mathews T, Kleyman SM, Conte RA. Centromeric aliphoid sequences are breakage prone resulting in pericentromeric inversion heteromorphism of qh region of chromosome 1. *Ann Genet* 1996;39:177-80.
4. Conte RA, Mathews T, Kleyman SM, Verma RS. Molecular characterization of 21p- variant chromosome. *Clin Genet* 1996;50:103-5.
5. Friedrich U, Caprani M, Niebuhr E, Therkelsen AJ, Jørgensen AL. Extreme variant of the short arm of chromosome 15. *Hum Genet* 1996;97:710-3.
6. Tho SP, Byrd JR, McDonough PG. Chromosome polymorphism in 110 couples with reproductive failure and subsequent pregnancy outcome. *Fertil Steril* 1982;38:688-94.
7. Brečević L, Kern J. C-band heteromorphism and the reproductive ability. *Period Biol* 1988;90:61-8.
8. Petković I. Quantitative analysis of constitutive heterochromatin of chromosomes 1,9 and 16 in children with congenital abnormalities. *Period Biol* 1990;92:335-9.
9. Podugolnikova OA, Blumina MG. Heterochromatic regions on chromosomes 1, 9, 16, and Y in children with some disturbances occurring during embryo development. *Hum Genet* 1983;63:183-8.
10. Blumberg BD, Shulkin JD, Rotter JJ, Mohandas T, Kaback MM. Minor chromosomal variants and major chromosomal anomalies in couples with recurrent abortion. *Am J Hum Genet* 1982;34:948-60.
11. Maes A, Staessen C, Hens L, Vamos E, Kirsch-Volders M, Lauwers MC et al. C heterochromatin variation in couples with recurrent early abortions. *J Med Genet* 1983;20:350-6.
12. Eiben B, Leipoldt M, Rammelsberg O, Krause W, Engel W. High incidence of minor chromosomal variants in teratozoospermic males. *Andrologia* 1987;19:684-7.
13. Irick H. A new function for heterochromatin. *Chromosome* 1994;103:1-3.
14. Nielsen J. Large Y chromosome (Yq+) and increased risk of abortion. *Clin Genet* 1978;13:415-6.
15. Nordenson I. Increased frequencies of chromosomal abnormalities in families with a history of fetal wastage. *Clin Genet* 1981;19:168-73.
16. Yakin K, Balaban B, Urman B. Is there a possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis? *Int J Urol* 2005;12:984-9.
17. Nakamura Y, Kitamura M, Nishimura K, Koga M, Kondoh N, Takeyama M et al. Chromosomal variants among 1790 infertile men. *Int J Urol* 2001;8:49-52.
18. Minocherhomji S, Athalye AS, Madon PF, Kulkarni D, Uttamchandani SA, Parikh FR. A case-control study identifying chromosomal polymorphic variations as forms of epigenetic alterations associated with the infertility phenotype. *Fertil Steril* 2009;92:88-95.
19. Nagvenkar P, Desai K, Hinduja I, Zaveri K. Chromosomal studies in infertile men with oligozoospermia & non-obstructive azoospermia. *Indian J Med Res* 2005;122:34-42.
20. Hong Y, Zhou YW, Tao J, Wang SX, Zhao XM. Do polymorphic variants of chromosomes affect the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer treatment? *Hum Reprod* 2011;26:933-40.
21. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960;20:613-6.
22. Mafra FA, Christofolini DM, Bianco B, Gava MM, Glina S, Belangero SI et al. Chromosomal and molecular abnormalities in a group of Brazilian infertile men with severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia attending an infertility service. *Int Braz J Urol* 2011;37:244-50; discussion 250-1.
23. Sahin FI, Yilmaz Z, Yuregir OO, Bulakbasi T, Ozer O, Zeyneloglu HB. Chromosome heteromorphisms: an impact on infertility. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:191-5.
24. Celep F, Karagüzel A, Ozeren M, Bozkaya H. The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;127:106-9.

25. Erdtmann B. Aspects of evaluation, significance, and evolution of human C-band heteromorphism. *Hum Genet* 1982;61:281-94.
26. Chatzimeletiou K, Taylor J, Marks K, Grudzinskas JG, Handyside AH. Paternal inheritance of a 16qh-polymorphism in a patient with repeated IVF failure. *Reprod Biomed Online* 2006;13:864-7.
27. Vorsanova SG, Yurov YB, Brusquant D, Carles E, Roizes G. Two new cases of the Christchurch (Ch1) chromosome 21: evidence for clinical consequences of de novo deletion 21P-. *Tsitol Genet* 2002;36:46-9.
28. Tavokina LV, Vorsanova SG, Zukin VD, Sopko NI, Zinchenko VM, Veselovskii VV et al. [A case of deletion of the short arm of the chromosome 21 (21p-) (christchurch chromosome) discovered prenatally: clinical and cytogenetic data]. *Tsitol Genet* 2004;38:26-30.
29. Eymery A, Callanan M, Vourc'h C. The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *Int J Dev Biol* 2009;53: 259-68.
30. Dalal Y. Epigenetic specification of centromeres. *Biochem Cell Biol* 2009;87:273-82.
31. Lyle R, Prandini P, Osoegawa K, ten Hallers B, Humphray S, Zhu B et al. Islands of euchromatin-like sequence and expressed polymorphic sequences within the short arm of human chromosome 21. *Genome Res* 2007;17: 1690-6.
32. Caglayan AO, Ozyazgan I, Demiryilmaz F, Ozgun MT. Are heterochromatin polymorphisms associated with recurrent miscarriage? *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36: 774-6.